



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia e Diagnostica in Medicina Interna

Indirizzo: Fisiopatologia delle Malattie del Fegato

Dipartimento Biomedico di Medicina Interna e Specialistica (DiBiMIS)

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

## POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS, SNPs) COME POSSIBILI MARCATORI GENETICI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI SVILUPPO DI EPATOCARCINOMA IN PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA HCV-CORRELATA

IL DOTTORE

**Dr. MARIA ELISA CAMPAGNA**

IL COORDINATORE

**Prof. PIERO LUIGI ALMASIO**

IL TUTOR

**Dr. LYDIA GIANNITRAPANI**

CICLO XXVI

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2016

# Indice

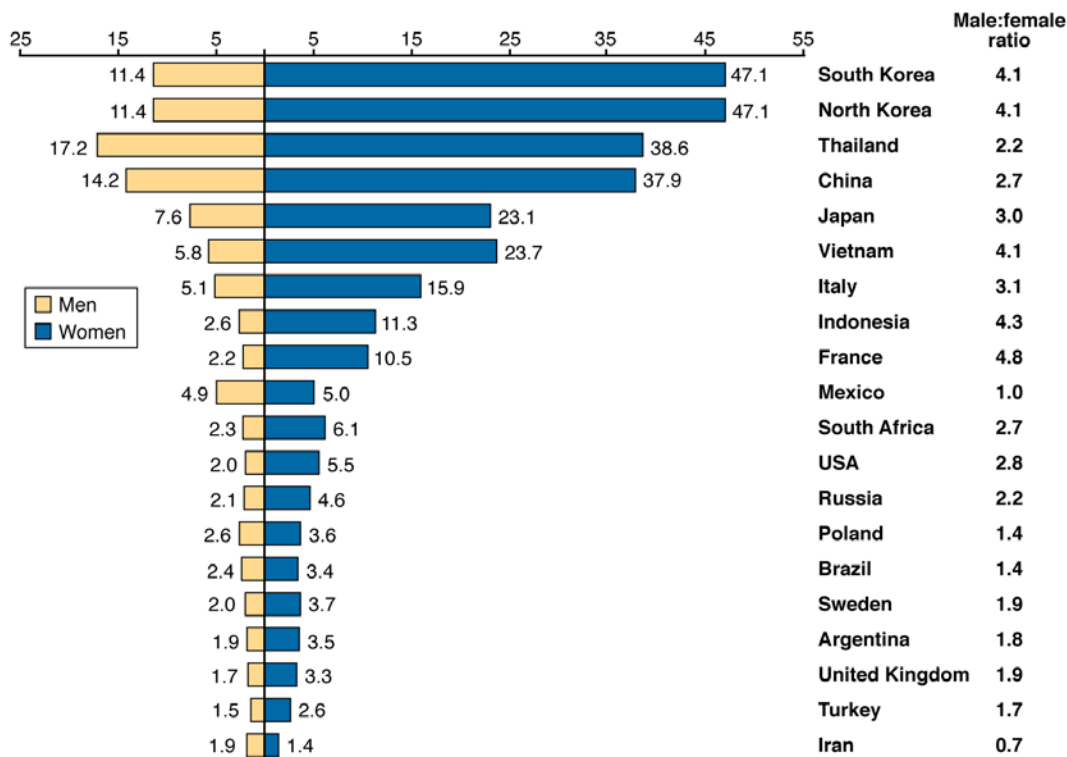
1. Epidemiologia del carcinoma epatocellulare
2. Fattori di rischio del carcinoma epatocellulare
3. Epatocarcinogenesi
4. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) e il carcinoma epatocellulare
5. Pazienti
6. Materiali e metodi
7. Conclusioni
8. bibliografia

## 1. Epidemiologia

L'epatocarcinoma (hepatocellular carcinoma, HCC) è il tumore primitivo più frequente del fegato, è il quinto per frequenza negli uomini (523.000 casi l'anno, il 7.9% di tutti i tumori) e il settimo nelle donne (216.000 casi l'anno, il 6.5 % di tutti i tumori), la terza causa di morte cancro-correlata. È un importante problema di salute mondiale. E' una neoplasia con prognosi severa, perchè nella maggioranza dei casi è associato a uno stato di cirrosi epatica, può avere uno sviluppo multifocale, si presenta con caratteristiche di elevata farmaco-resistenza, insorge su pazienti con severe turbe emocoagulative, condizioni, queste, che spesso limitano la possibilità terapeutiche. La distribuzione geografica della mortalità è simile a quella dell'incidenza. La mortalità geografica con cui si presenta è principalmente connessa ai fattori di rischio. La maggior parte dei casi di HCC circa l'80%, si verificano in Africa sub-Sahariana e in Asia orientale, con tassi di incidenza di circa 20 casi ogni 100.000 individui. Nei paesi dell'Europa meridionale come Spagna, Italia e Grecia si tendono ad avere livelli intermedi di incidenza circa 10-20 casi ogni 100.000 individui, mentre, nel nord America, sud America, nord Europa ed Oceania si registra una bassa incidenza, meno 5 casi per 100.000 individui (Fig.1)

L'epatocarcinoma è raramente diagnosticato durante i primi decenni di vita, salvo nelle popolazioni dove l'infezione del virus dell'epatite B è endemica. L'età media di diagnosi è 55-59 anni in Cina e 63-64 in Europa e nord America. Nelle popolazioni a basso rischio, l'età media di incidenza è intorno ai 75 anni (Fig.1).

Questa neoplasia, è predominante nel sesso maschile con il più alto rapporto M:F nelle area ad alta incidenza (Fig.1).



**Figure 1.**

Age-standardized incidence rates of liver cancer per 100,000 person-years, shown for different regions of the world and for men and women (GLOBOCAN 2002)

In generale, l'incidenza e la mortalità dell'epatocarcinoma (da distinguere dal numero di casi) sono lentamente diminuiti nelle zone ad alta e media incidenza, tra cui Cina e Giappone, mentre si segnala un aumento nelle aree a bassa incidenza, quali Stati Uniti e Canada. La percentuale dei casi di HCC con HBV è progressivamente diminuito, mentre, la percentuale dei casi associata ad HCV è in aumento. I dati di mortalità dell'OMS di diversi paesi europei tra il 1980 e 2004 hanno indicato un incremento di questa in paesi quali l'Austria, Germania, e Svizzera, mentre, si segnala un decremento significativo della mortalità in Francia e Italia. L' HBV e l'HCV rimangono i principali fattori di rischio per epatocarcinoma. È stimato che ci sarà un aumento della mortalità HCV-correlata di 2,5 volte in tutto il mondo tra il 2000 e il 2020, che può aumentare a 3,5 volte in Egitto, paese con la più alta prevalenza d'infezione HCV-correlata. L'HCC HBV e HCV correlato si potrebbe prevenire aumentando: lo screening nei pazienti infetti, gli approcci che

riducono la trasmissione, la vaccinazione contro l'HBV, trattamento dei pazienti con infezioni croniche HBV-HCV correlate. Riducendo: l'espansione di aflatossine, cofattori di progressione quali assunzione di alcool e sindrome metabolica, inoltre, identificando gruppi ad alto rischio per la sorveglianza, la diagnosi precoce e il trattamento.

## **2. Fattori di rischio**

I maggiori fattori di rischio per HCC includono l'infezione da HBV o HCV, l'epatopatia alcolica e, lo stato denominato NASH (nonalcoholic steatohepatitis). I fattori di rischio minori sono invece il consumo di cibi contaminati con aflatossina B, il diabete, l'obesità e alcune condizioni ereditarie come l'emocromatosi e altri disordini metabolici<sup>1</sup>. La cirrosi epatica rappresenta il fattore di rischio più importante, la maggior parte dei casi di neoplasia si presenta su fegato cirrotico. Malattia epatica avanzata legata principalmente ad infezioni virali croniche HBV-HCV correlate. L'HBV e HCV promuovono la cirrosi epatica che si riscontra nell'80%-90% dei pazienti con HCC. In cinque anni il rischio cumulativo di sviluppare il carcinoma epatocellulare con cirrosi epatica varia tra il 5% e il 30% a seconda dell'eziologia (più alta nei soggetti con HCV), alla regione o gruppo etnico (più alta negli asiatici), e lo stadio della cirrosi (più alta nei soggetti con malattia scompensata)<sup>2</sup>. Il 5% della popolazione mondiale circa 350-400 milioni di soggetti è affetto da epatopatia cronica HBV-correlata, il 75% degli individui sono asiatici<sup>3</sup>.

L'infezione cronica da HBV rappresenta il 50% dei casi totali, è il fattore di rischio dominante nella maggior parte delle aree dell'Asia, Africa sub-Sahariana dove si ha alta incidenza per epatocarcinoma, con l'eccezione per il Giappone dove il principale fattore di rischio è l'infezione cronica da HCV. L'antigene di superficie HbsAg tra i soggetti con HCC varia ampiamente: il 3% in Svezia, 10% negli Stati Uniti, 10%-15% in Giappone, il 19%

in Italia, 55% in Grecia e il 70% in Corea del sud. Nelle aree ad alta incidenza per epatocarcinoma, in Asia, l'infezione HBV è in gran parte acquisita attraverso la trasmissione materno-fetale, mentre la trasmissione tra fratelli in giovane età è più comune in Africa. Si stima che il 90% dei paesi routinariamente vaccinano i neonati contro l'HBV, l'effetto della vaccinazione generale nell'infanzia contro l'HBV ha ridotto il tasso dell'epatocarcinoma HBV-correlato nelle nazioni ad alta endemia. Finora questo trend è stato osservato nei bambini di Taiwan, ma ci si aspetta che divenga più evidente con la crescita dei bambini vaccinati<sup>4</sup>. La maggior parte dei soggetti con infezione da HBV che sviluppano HCC hanno cirrosi epatica secondaria a cronica necro-infiammazione. L'HBV può causare HCC anche in assenza di cirrosi, sebbene l'epatocarcinoma HBV-correlato (il 70%-90%) si sviluppa in pazienti con cirrosi<sup>5</sup>. Sono stati segnalati fattori che sembrano aumentare il rischio di sviluppare HCC, fattori demografici (sesso maschile, età avanzata, origini asiatiche o africane, storia familiare di epatocarcinoma), virali (elevati livelli di replicazione HBV), genotipo HBV, durata dell'infezione; coinfezione con HCV, HIV, o HDV, clinici (cirrosi), e ambientali (esposizione aflatossina, assunzione di alcolici o tabacco). Il rischio di HCC è aumentato in pazienti con elevati livelli di replicazione di HBV, rilevati con test per HbeAg e livelli di HBV-DNA. Uno studio taiwanese ha valutato l'effetto di replica HBV sul rischio di sviluppare HCC tra 11.893 uomini taiwanesi seguiti per circa 8,5 anni. L'incidenza di HCC era di 1.169 per 100.000 persone l'anno in pazienti HbsAg positivi e HBeAg-positivi, 324 per 100.000 persone l'anno che erano solo HbsAg positivi, e 39 per 100.000 persone l'anno HbsAg negativi. I rischi relativi di sviluppare HCC era 60 volte aumentato nei pazienti HbsAg e HBeAg positivi, mentre, di 10 volte nei pazienti con solo HbsAg positività<sup>6</sup>. In un altro studio prospettico taiwanese REVELAL-HBV in una coorte di 3.653 pazienti (HbsAg positivi), si è visto che l'incidenza di cirrosi e HCC aumenta in proporzione al livello sierico di HBV-DNA da non rilevabile (<300 copie/ml) a > 0 = a

(1.000.000 copie/ml). Osservazioni significative dopo aggiustamenti per età, sesso, assunzione di alcol, e status HBeAg<sup>7</sup>. L'incidenza del rischio di HCC aumenta anche in pazienti portatori inattivi dell'HBV (sieronegativi per HbeAg con livelli di HBV-DNA > a 10.000 copie/ml con normali livelli sierici degli enzimi epatici) di circa 5 volte superiore rispetto ai controlli (HbsAg negativi)<sup>8</sup>. Sono stati identificati diversi genotipi di HBV (A-H), si è visto avere una diversa distribuzione geografica e etnica. Studi condotti in Asia hanno mostrato un'associazione tra infezione da genotipo C e severa malattia epatica, cirrosi, mentre il genotipo B è associato con lo sviluppo di HCC soprattutto in uno studio taiwanese in pazienti con età inferiore ai 50 anni<sup>9</sup>.

Per quanto riguarda il ruolo dell'infezione da HCV, sul rischio di sviluppare HCC, diversi studi prospettici hanno dimostrato un significativo incremento dell'incidenza dell'epatocarcinoma in una coorte di pazienti con infezione HCV-correlata, rispetto ad una coorte di HCV-negativi<sup>10</sup>. L'incidenza di cirrosi (e conseguente HCC) dopo 25-30 anni dopo l'infezione è del 15%-35%<sup>11</sup> ed è più alta negli individui che hanno ricevuto emoderivati ed emofilici. Il rischio per HCC può variare in relazione alla quantità di virus nei prodotti contaminati o la ripetuta esposizione, inoltre, alla presenza di comorbidità quali (co-infezioni con HBV o HIV, diabete, obesità, steatosi), il genotipo virale (1b), il consumo di alcolici, e l'età.

L'esposizione alimentare all'aflatossina B1, contenuta nei funghi *Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*, è un importante cofattore per lo sviluppo dell'HCC in alcune aree dell'Africa e dell'Asia. Una volta ingerita AFB1 è metabolizzata in un intermediario attivo, che provoca una mutazione di p53<sup>12</sup> riscontrato nel 30%-60% pazienti con HCC da infezione da HBV<sup>13</sup> nelle zone endemiche.

Diversi studi, condotti in Giappone e nel Sud Europa, hanno mostrato che il consumo di caffè è associato ad una riduzione del rischio di epatocarcinoma. Il consumo di alti livelli di caffè è associato con riduzione della fibrosi in pazienti con infezione cronica da HCV<sup>14</sup>. Tutti gli studi hanno osservato una relazione inversa tra consumo di caffè e rischio di epatocarcinoma. I meccanismi attraverso i quali il caffè riduce il rischio non sono chiare, si pensa che riducendo i livelli di insulina, conseguenza il rischio di diabete mellito tipo2 un fattore di rischio per la steatosi epatica, la cirrosi e HCC. I pazienti con malattie ereditarie metaboliche come l'emocromatosi sviluppano l'HCC in oltre il 45% dei casi, più spesso su una pre-esistente cirrosi. Il carcinoma epatocellulare è, anche, ben documentato come complicazione della cirrosi da deficit di alfa-1-antitripsina. Occasionalmente l'epatocarcinoma si sviluppa in pazienti affetti dalla malattia di Wilson ed alcune porfirie, ma solo in presenza di cirrosi<sup>14</sup>.

L'abuso prolungato di alcool è un ben definito fattore di rischio per l'epatocarcinoma, sia indipendentemente (con il rischio aumentato di un fattore oscillante da 1.5 a 2.0), sia in combinazione con l'infezione da HCV e, in minore entità, con l'infezione da HBV. L'alcool di per se non è un cancerogeno e la degenerazione neoplastica avviene sempre attraverso la cirrosi alcolica.

L'obesità, il diabete e la steatosi sono stati riconosciuti come cause di carcinoma epatocellulare, una meta-analisi di studi pubblicati casi-controllo riporta un'associazione significativa, tra diabete mellito tipo2 ed HCC, questa associazione era indipendente da epatiti virali o alcoliche<sup>15</sup>. Gli individui con infezione HCV hanno un rischio maggiore sviluppare diabete mellito tipo2, rispetto a quelli con infezione HBV<sup>16,17</sup>.



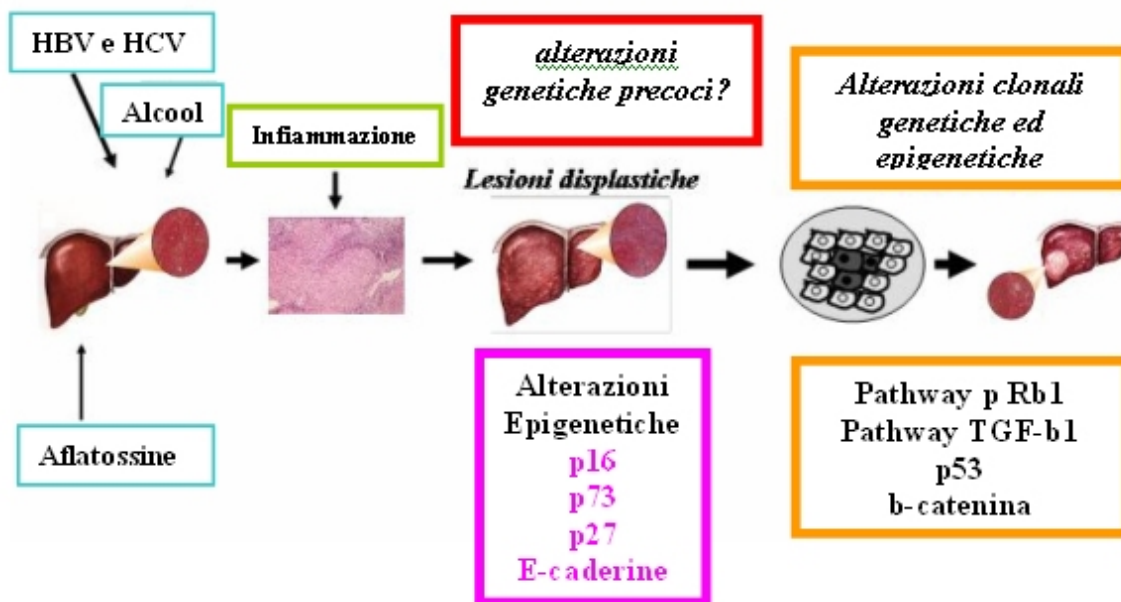
### ***3. Epatocarcinogenesi***

L'epatocarcinogenesi è un processo complesso e multi-step, meno definito rispetto ai processi evolutivi di altri tipi di tumore, che risulta dalla combinazione di alterazioni genetiche ed epigenetiche che inducono gli epatociti a sviluppare un fenotipo maligno (Fig 2).

Numerosi studi hanno dimostrato la sostanziale eterogeneità genetica degli HCC e l'alterazione di molte vie di segnalazione è già stata descritta nella proliferazione cellulare, nell'angiogenesi, nell'invasione e nella capacità metastatica del HCC.

Le informazioni attualmente disponibili su una possibile classificazione dell'HCC su base molecolare hanno fornito risultati contrastanti e non ancora utilizzabili nella pratica clinica. Il motivo principale è probabilmente la eterogeneità delle caratteristiche molecolari dell'HCC (tipi diversi in base all'eziologia della malattia di fegato, e non solo).

Nonostante ciò, diversi gruppi hanno proposto classificazioni molecolari basate su differenti profili di espressione genica a livello del tessuto tumorale (o del tessuto del fegato cirrotico circostante), potenzialmente utili nella predizione del rischio di recidiva post-resezione epatica, di rapida progressione della malattia o della capacità di dare metastasi.



**Figura 2**

I diversi agenti eziologici causano danni al DNA delle cellule epatiche, stimolandone morte e rigenerazione. Il continuo alternarsi di processi distruttivo-rigenerativi potrebbe portare a una crescita cellulare incontrollata e veloce che a sua volta aumenta notevolmente le probabilità di danni a livello genetico e diminuisce l'efficienza della riparazione di eventuali danni al DNA.

Questi fenomeni aumentano le possibilità che alcune anomalie non riparate vengano fissate e quindi trasmesse alla progenie cellulare, dando origine a linee di cellule alterate e all'insorgenza di lesioni permanenti che nel tempo possono evolvere in neoplasia. L'HCC si sviluppa in condizioni di epatite cronica e cirrosi epatica, caratterizzati da infiammazione cronica del fegato. Durante il processo infiammatorio, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono causare danni a importanti componenti cellulari, come DNA, RNA e proteine, che possono contribuire alla trasformazione maligna delle cellule.

Durante lo stadio preneoplastico, il fegato diventa la sede di epatiti croniche o di cirrosi, o di entrambe, e la proliferazione degli epatociti, ormai modificati, è accelerata dall'elevata induzione delle vie mitogeniche.

Tali lesioni epatiche, sono caratterizzate dalla formazione di noduli iperplastici con normali caratteristiche istologiche ma circondati da estesi depositi di collagene. Tali lesioni possono andare incontro a reversione fenotipica o evolvere in noduli displastici.

Nei noduli displastici, gli epatociti sono caratterizzati da accumulo di lipidi e glicogeno nel citoplasma (cellule chiare), da alterazioni del numero di nuclei per unità d'area e da una marcata e crescente instabilità genomica.

I noduli displastici possono evolvere in epatocarcinoma e acquisire eventualmente la capacità di invadere lo stroma fibroso circostante ed i vasi, estrinsecando il loro elevato potenziale metastatico.

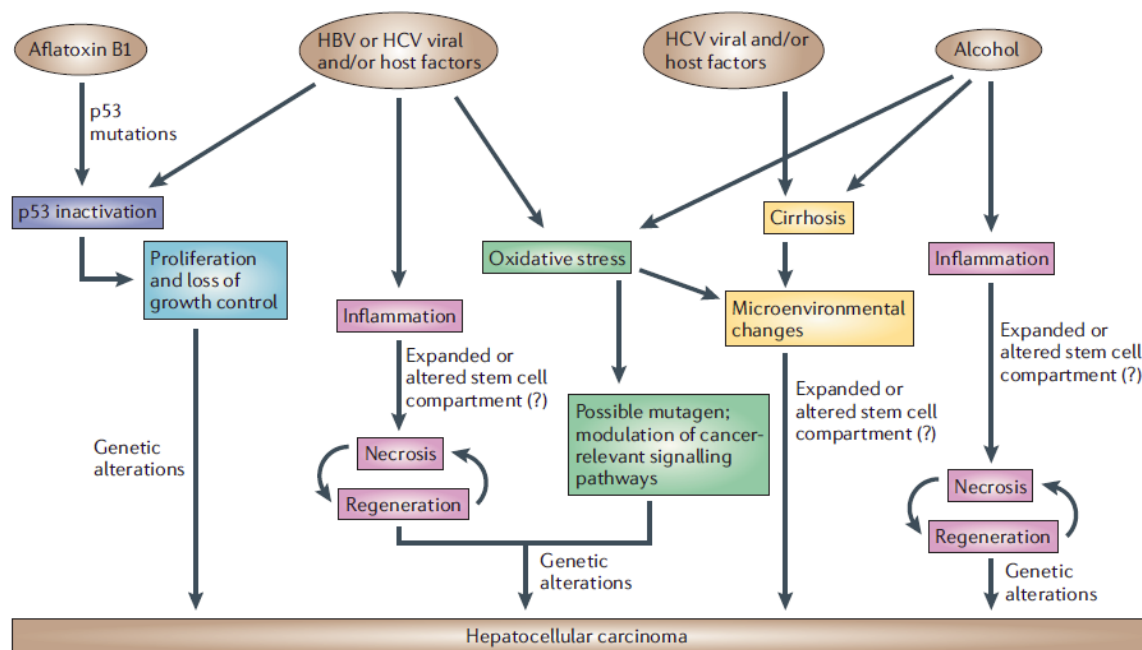
L'epatocancerogenesi può quindi essere legata all'accumulo di alterazioni genomiche di origine genetica ed epigenetica, che possono poi causare alterazioni delle vie di trasmissione e quindi la sregolazione di importanti vie metabolico-funzionali degli epatociti. Nelle ultime decadi numerosi studi sono stati eseguiti per identificare molecole chiave interessate nello sviluppo e nella progressione dell'epatocarcinoma.

L'analisi molecolare dell'epatocarcinoma ha portato all'individuazione di numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche a carico di oncogeni e di soppressori tumorali quali p53, p16INK4A,  $\beta$ -catenina e Rb. E' stato dimostrato che i geni c-myc e Ciclina D1 sono frequentemente iper-espressi negli HCC umani.

Per quanto riguarda le alterazioni genetiche, l'analisi di epatocarcinomi correlati con HBV ha mostrato un'elevata frequenza di mutazioni a carico dell'oncosoppressore p53 in soggetti caratterizzati da uno stadio avanzato della malattia rispetto a coloro che presentano lesioni negli stadi iniziali

Nel caso di epatocarcinomi correlati ad HCV è stato dimostrato che una proteina non strutturale del virus, NS5A, è in grado di legare p53, impedendo il suo accesso all'interno del nucleo. Negli abitanti delle regioni dove la causa principale dell'insorgenza della

neoplasia è rappresentata dalla contaminazione del cibo da parte dell'aflatossina B1, l'inibizione di p53 si manifesta invece negli stadi iniziali della malattia. Ciò sta ad indicare l'importanza della soppressione di p53 nello sviluppo del CE in quanto questo meccanismo faciliterebbe il potenziale proliferativo in un contesto più ampio di danno al DNA, contribuendo all'instabilità genomica (Figura 3).



**Figura 3**

Le alterazioni epigenetiche, possono indurre cambiamenti ereditabili o no nella metilazione del DNA e modificazioni degli istoni che modulano l'espressione dei geni ma che non implicano cambiamenti nella sequenza primaria del DNA. E' stato dimostrato che gli epatocarcinomi umani sono caratterizzati da aberranti patterns di metilazione del DNA. Metilazione aberrante è stata osservata sia negli stadi iniziali sia in quelli tardivi .

L'inattivazione di p16INK4A, in seguito a ipermetilazione del suo promotore ad esempio, impedisce l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 favorendone un'incontrollata progressione. Si osserva ipermetilazione a carico di vari geni tra i quali COX-2 (cicloossigenasi 2), E-caderina e p16INK4A .

E' ampiamente dimostrato che la COX-2 è un importante target molecolare nella terapia antitumorale. COX-2 è cronicamente iper-espressa in diversi tumori incluso l'HCC.

In pazienti con HCC la presenza di una iper-espressione della COX-2 nel fegato cirrotico circostante i tumori è stata associata ad una ridotta sopravvivenza, ed alla comparsa di recidive dopo trattamento chirurgico.

Sono stati identificati altri diversi mediatori pro-infiammatori, come le citochine, i fattori di trascrizione quali NFκ-B, che facilitano la promozione e la progressione tumorale.

Il fattore di trascrizione NFκ-B è stato ampiamente dimostrato essere un link tra infiammazione e cancro, ed è costitutivamente attivato in diversi tipi di tumore, incluso l'HCC.

Inoltre è stato dimostrato che durante il processo di epatocancerogenesi, numerose vie di segnale risultano alterate. Una delle vie maggiormente studiate e caratterizzate è la via di trasduzione di RAS, implicata nel controllo dell'apoptosi, della crescita cellulare e della differenziazione. L'induzione di Ras determina l'attivazione di una serie di effettori a valle (Raf, Mek 1/2, Erk 1/2) con conseguente attivazione trascrizionale di bersagli nucleari quali c-Fos, c-Jun e c-Myc. Negli epatocarcinomi umani si è osservata iperespressione di Ras associata all'inattivazione degli inibitori dei suoi effettori. E' stata dimostrata ad esempio l'inattivazione di RKIP (Raf kinase inhibitory protein), gene che inibisce la fosforilazione e quindi l'attivazione di Mek 1/2, e DUSP1 (Dual specificity phosphatase 1), inibitore di Erk 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase). Altri importanti effettori di Ras sono RASSF1A (Ras associated factor1) e NORE1A (Novel Ras effector1). Tali proteine

possono contrastare l'attività di Ras inducendo effetti proapoptotici. Negli epatocarcinomi umani, come nel tumore al polmone, al pancreas e al colon-retto, è stata dimostrata ipermetilazione e perdita di eterozigosi a carico dei promotori dei geni di RASSF1A e NORE1A . La perdita dell'espressione degli inibitori di Ras nei CE umani fa sì che venga promossa un'incontrollata crescita cellulare.

La via di segnale Wnt riveste un ruolo importante nel controllo dello sviluppo embrionale e della proliferazione cellulare; in un contesto patologico essa svolge un ruolo chiave nello sviluppo e nella differenziazione tumorale. In assenza del segnale Wnt, la  $\beta$ -catenina, suo principale effettore, viene catturata dal complesso proteico APC (Adenomatous polyposis coli)/Axina1/GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) che ne favorisce la degradazione proteasomica . Quando Wnt si lega al suo recettore, la trasmissione del segnale a livello citoplasmatico fa sì che venga soppressa l'attività di GSK3 $\beta$ , stabilizzando la  $\beta$ -catenina. In questo modo la proteina migra nel nucleo dove lega i fattori di trascrizione LEF1/TCF e attiva i geni bersaglio, quali c-myc e ciclina D1. Essa interagisce a livello citoplasmatico con la E-caderina favorendo l'adesione cellula-cellula. Nei CE umani sono state riscontrate numerose mutazioni a carico dell'esone 3 del gene della  $\beta$ -catenina; tali mutazioni proteggono la  $\beta$ -catenina dalla degradazione e ne favoriscono l'accumulo a livello nucleare, alterando le normali interazioni cellula-cellula e favorendo la proliferazione e lo sviluppo di fibrosi e cirrosi . E' stato inoltre osservato che gli epatocarcinomi umani con elevata instabilità genomica mostrano bassi livelli di mutazioni a carico della  $\beta$ -catenina. Inoltre, nel 5-10% dei CE umani sono state osservate mutazioni a carico di Axina 1 e iperespressione del ligando Wnt e del suo recettore.

La via JAK/STAT partecipa alla regolazione delle risposte cellulari alle citochine ed ai fattori di crescita, e gioca un importante ruolo in alcuni processi cellulari come la differenziazione, la proliferazione e l'apoptosi . La trasduzione del segnale generato dall'attività delle

citochine e dei fattori di crescita e mediato dalle proteine JAK e STAT, induce una risposta intracellulare, modificando l'espressione genica.

Le proteine STAT 3 e 5, presenti in forma inattiva nel citoplasma, si attivano in seguito alla fosforilazione mediata da JAK o dai recettori ad attività tirosin-cinasi dei fattori di crescita. Una volta attivate, STAT 3 e 5, entrano nel nucleo dove agiscono come fattori di trascrizione. Nelle cellule normali l'attivazione delle proteine STAT è transiente e sotto rigoroso controllo. Nei tumori a causa dell'inattivazione di inibitori specifici di STAT (SOCS 1-3) si ha una mancata modulazione del segnale che, divenendo attivato in modo costitutivo, provoca uno sbilanciamento di fattori antiapoptotici e pro-apoptotici quali Bcl-x, ciclina D1 e D2, Mcl-1 etc.

Oltre alle vie sopracitate, nel corso dell'epatocancerogenesi risultano alterate altre vie come la via di segnale della 3-fosfoinositolo cinasi (PI3K) e di mTOR (PI3K/AKT/mTOR), del fattore di crescita degli epatociti e del fattore di transizione mesenchimale-epiteliale, la via Hedgehog e del segnale apoptotico.

Molti studi hanno mostrato l'importante ruolo che il fattore di trascrizione Yin Yang 1 (YY1) e la Raf-1 Kinase Inhibitor Protein (RKIP) hanno nella biologia neoplastica. YY1 agisce come attivatore o repressore di molti geni critici e quando up-regolato favorisce differenti aspetti della tumorigenesi. Il comportamento di YY1 come attivatore o repressore dipende dal contesto del promotore e dall'interazione con altre proteine regolatorie. RKIP inibisce differenti chinasi nelle vie delle MAPK e di NF- $\kappa$ B, antagonizzando così le loro attività oncogene. RKIP è un importante promotore dell'apoptosi farmaco-indotta. Tra YY1 e RKIP possono esistere influenze reciproche. La sovra-espressione di YY1 può direttamente minimizzare la trascrizione di RKIP, che, a sua volta, tramite i suoi effetti su NF- $\kappa$ B, può inibire la trascrizione di YY1. (Figura 4).

Altro ruolo fondamentale è stato attribuito alle *chaperones molecolari* calcio-dipendenti, una classe funzionale di famiglie proteiche che si associano alle proteine neosintetizzate in modo da prevenirne l'aggregazione e consentire il loro corretto ripiegamento (folding) sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche. Il reticolo endoplasmatico è la sede della sintesi, del ripiegamento (*folding*) e delle modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana e secrete. Rappresenta un preciso sistema di controllo di qualità atto ad assicurare che solo le proteine correttamente ripiegate e funzionanti possano essere rilasciate dall'ER e raggiungere la loro destinazione finale, mentre le proteine malripiegate o non funzionanti sono trattenute nel ER e, in seguito, traslocate nel citosol



per la degradazione da parte del proteosoma 26S, processo mediato dall'attivazione del sistema *ER Associated Degradation (ERAD)*. (Figura 5)

L'azione del ER sul folding delle proteine è altamente sensibile a stimoli che inducono modificazioni dei livelli di energia intracellulari, dello stato redox o della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$ . Tali stimoli sono in grado di modificare la capacità del *folding* del ER, la quale risulta nell'accumulo e nell'aggregazione di proteine non ripiegate o mal ripiegate nel lume del reticolo stesso, una condizione che viene definita come *stress del reticolo endoplasmatico*. Tale formazione di aggregati proteici è tossica per le cellule e rappresenta la base biochimica di numerose condizioni fisiopatologiche associate allo *stress del reticolo endoplasmatico (ER stress)* inclusa l'ischemia, le malattie neurodegenerative, il diabete e i tumori .

Allo scopo di combattere gli effetti deleteri associati allo stress del ER, le cellule hanno evoluto diverse strategie protettive, le quali sono state collettivamente incluse nel processo denominato *Unfolded Protein Response (UPR)*. Questa complessa risposta cellulare è mediata dall'attivazione di tre recettori trans membrana del reticolo (*Sensori di stress*) denominati rispettivamente: *Pancreatic ER Kinase (PERK)*, *Activating Transcription Factor 6 (ATF6)* e *Inositol-Requirng Enzyme 1 (IRE1)*. In assenza di stress del ER i tre recettori del ER vengono mantenuti in uno stato inattivo attraverso la loro associazione con la molecola chaperone, *Glucose Regulated Protein 78 (GRP78)*. Nei processi tumorali, le cellule tumorali si adattano a stress cronico nel microambiente tumorale inducendo l'iper espressione di GRP78 / BiP che sembra così promuovere la proliferazione cellulare, la sopravvivenza tumorale la capacità di metastatizzare, e la resistenza ad un'ampia varietà di terapie. L'iperespressione GRP78 potrebbe servire, pertanto, come biomarcatore per il comportamento del tumore e la risposta al trattamento. Un altro promettente bersaglio molecolare è la proteina heat-shock 90 (Hsp90), altro chaperone essenziale per l'attività di

numerosa oncoproteine, come Raf-1, NF $\kappa$ B, ERK e Akt. La Hsp90, sembrerebbe risultare iperespressa nei tumori, e in particolare nell'HCC. L'iperespressione della Hsp90 è stata associata ad una prognosi sfavorevole

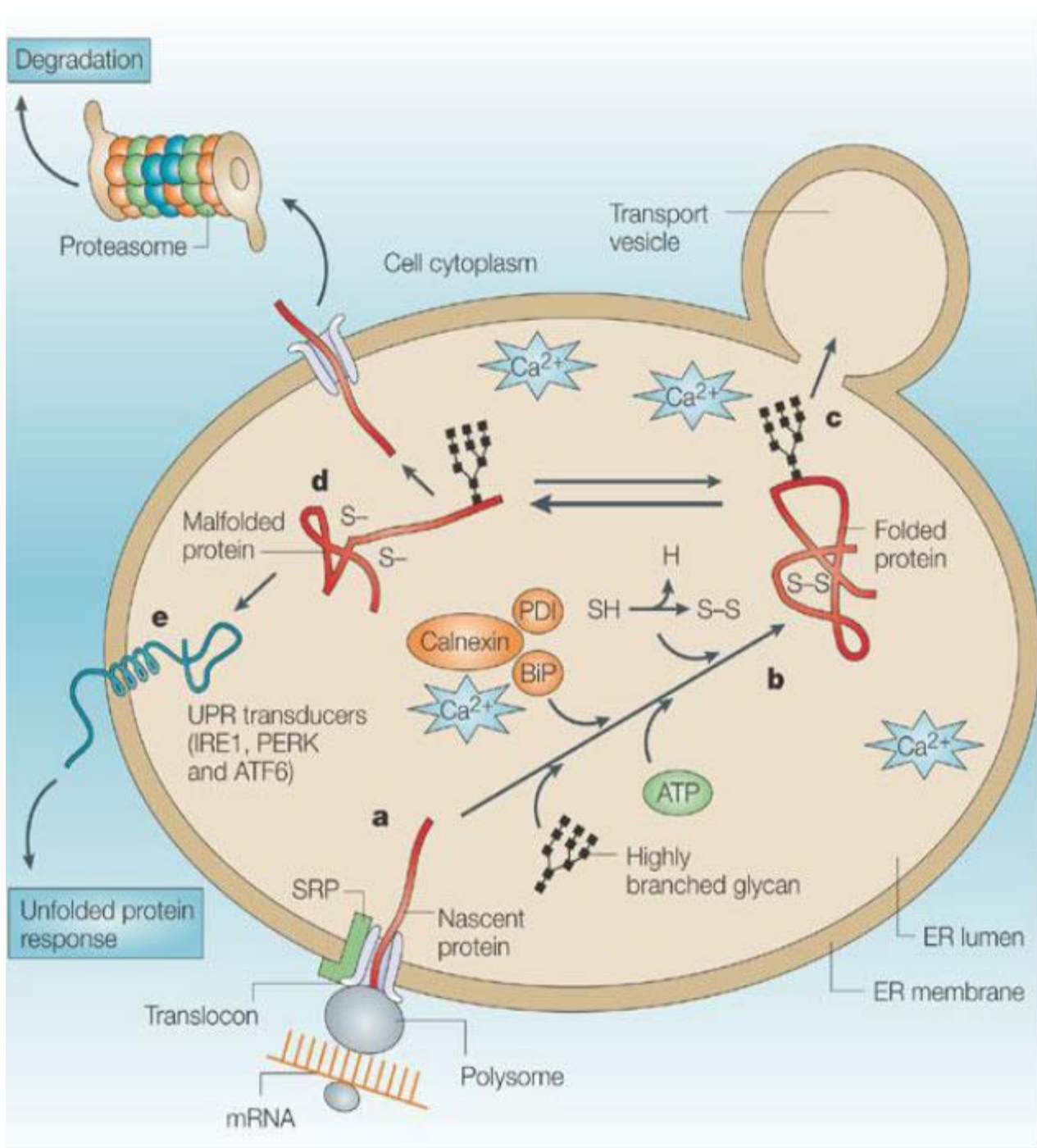


Figura 5

## **Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) e il carcinoma epatocellulare**

Gli SNPs sono una classe di alterazioni genetiche oggi ampiamente studiate. Essi sono stati associati a innumerevoli patologie, tramite studi prospettici o caso-controllo. Gli SNPs sono delle variazioni di un singolo nucleotide nella sequenza del DNA genomico. Come tutte le varianti genetiche, possono presentarsi in omozigosi o in eterozigosi. Il nucleotide, ovvero l'allele che viene studiato in associazione ad una patologia è detto di rischio, a meno che questo non abbia un effetto protettivo. La presenza dell'allele di rischio può essere determinante se questo è presente in entrambi i loci, ma in alcuni i casi anche se presente solo in eterozigosi. Un SNP che risiede in un esone e porta al cambiamento di un aminoacido, si dice nsSNP (SNP non sinonimo). Se invece l'SNP non porta alla variazione del peptide allora è detto sSNP (SNP sinonimo).

Gli SNPs sono classificabili anche in base alla loro posizione e relazione con la patologia. Alcuni SNPs risiedono in promotori o regioni 3' o 5' UTR, essi agiscono direttamente incrementando i livelli di alcuni fattori di crescita o citochine. Altri provocano mutazioni missenso. In questi casi rientrano in una categoria di SNPs detti funzionali, caratterizzati quindi da un'azione biologica diretta e tangibile.

Ad ogni SNP viene associato un codice numerico preceduto dalla sigla "rs". Ogni SNP ha delle frequenze che possono variare parecchio da popolazione a popolazione.

sono tanti gli SNPs associati all'HCC. Tramite uno studio bioinformatico ne abbiamo selezionato e studiato alcuni, seguendo dei precisi criteri che saranno illustrati in seguito.

### **L'rs430397 A/G sul gene *GRP78***

L'SNP rs430397 G/A è localizzato nella porzione 3'-terminale del quinto introne del gene GRP78. Questo polimorfismo è stato associato alla cirrosi epatica e all'HCC in uno studio

su popolazione cinese<sup>18</sup> e mette in evidenza che i portatori dell'allele A, anche in eterozigosi hanno un rischio maggiore di HCC rispetto agli omozigoti GG. Questo rischio aumenta ulteriormente se si considerano i soggetti HBV-correlati.

GRP78 è un gene di circa 6,5 kb che codifica per una proteina di circa 72 kDa che fa parte della famiglia degli chaperons molecolari. Gli chaperons molecolari sono una classe funzionale di famiglie proteiche, la cui funzione predominante è la prevenzione di associazioni non corrette e aggregazione di catene polipeptidiche non ripiegate, sia in condizioni fisiologiche che in condizioni di stress. GRP78 si attiva in particolare in risposta ad uno stress del reticolo endoplasmatico (RE).

Quando il reticolo endoplasmatico eccede la sua capacità di "ripiegare" le catene polipeptidiche nascenti si attiva un complesso proteico detto UPR, costituito da tre componenti: PERK, IRE1 e ATF6. Questi tre enzimi sono normalmente sequestrati da GRP78, in caso appunto di stress del reticolo, GRP78 si dissocia dal complesso UPR, che è così libero di agire. Il risultato finale dell'attivazione UPR è quello di impedire ulteriore ingresso di polipeptidi nel RE e di ridurre la sintesi proteica .

### **L' rs 2070150 C/G nel gene *ATF6***

In uno studio su una coorte di pazienti asiatici l'SNP rs2070150 C/G localizzato nella regione genica del gene *ATF6*, è stato associato significativamente con la suscettibilità all'HCC in soggetti HBV-positivi. Tale validazione è stata effettuata in quattro gruppi indipendenti<sup>19</sup>. Inoltre, la presenza dell'rs2070150 sembrerebbe associata ad un aumento significativo dei livelli del messaggero codificante per *ATF6*, e dei suoi geni target come GRP78, XBP1 e CHOP.

### **L' rs 2596542 e rs 2596538 nel gene *MICA***

MICA è una proteina di membrana riconosciuta dal recettore NKG2D espresso dalle cellule "natural killer" (NK) e cellule T. In risposta all'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico, si assiste ad un decremento dei livelli di MICA che compromette la citotossicità mediata da NKG2D. Inoltre, nei pazienti con HCC in stadio avanzato si assiste al rilascio di MICA (soluble MICA) nel plasma ed a una riduzione della proteina di membrana. Tale condizione favorirebbe una scarsa attivazione delle cellule NK e T contro le cellule infettate dal virus.

Negli ultimi anni diversi studi hanno messo in evidenza una associazione del polimorfismo rs2596542 con l'HCC. In particolare è stato osservato come la presenza dell'allele A rappresenti un fattore di rischio per HCC HCV-correlati <sup>20</sup>. Gli stessi autori in un successivo studio, affermano che i portatori dell'allele G, anche in eterozigosi, hanno un rischio maggiore di sviluppare HCC, ma questa volta solo se HVB-correlati. Altri autori, invece, in uno studio su una piccola popolazione caucasica evidenziano la presenza dell'allele minore A come fattore protettivo per gli HCC HCV-correlati, ribaltando così i dati ottenuti sulla popolazione giapponese .

Un altro polimorfismo del gene MICA analizzato è l'rs2596538. Questo polimorfismo è localizzato a monte del gene MICA. Uno studio su pazienti asiatici<sup>21</sup> dimostra che la presenza dell'allele G determina l'incremento dei livelli della proteina MICA, dovuto ad un'aumentata affinità di legame tra il fattore trascrizionale SP1 e il promotore del gene MICA. Inoltre, la presenza dell'allele G determina un aumento del rischio di HCC HCV-correlati. Ad oggi non sono noti studi riguardanti popolazioni caucasiche.

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORFISM, SNP) COME POSSIBILI MARCATORI GENETICI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI EPATOCARCINOMA IN PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA HCV-CORRELATA**

L'80% dei soggetti con infezione da virus dell'epatite C (Hepatitis C Virus, HCV) presenta una cronicizzazione dell'infezione che nel 15-20% dei casi porterà allo sviluppo di cirrosi epatica. La cirrosi epatica è considerata il più importante fattore di rischio per lo sviluppo dell'epatocarcinoma (hepatocellular carcinoma, HCC); quest'ultimo è responsabile dell'85-90% circa delle neoplasie a carico del fegato, ed è il quinto più comune tipo di cancro ed è la terza causa di morte per cancro nel mondo. Al momento non vi sono marcatori molecolari capaci di predire il rischio di sviluppo di HCC in pazienti con cirrosi HCV-correlati. La mortalità dell'HCC varia in base alla localizzazione geografica e ai gruppi etnici. Queste osservazioni epidemiologiche spiegano l'interesse nel trovare fattori genetici dell'ospite in grado di spiegare la variabilità che contraddistingue il decorso dell'infezione da HCV.

La diversa suscettibilità allo sviluppo di tumori è associata alla presenza di determinati polimorfismi a singolo nucleotide (single nucleotide polymorphisms, SNPs): le varianti genetiche polimorfiche sono dei possibili candidati come marcatori molecolari. Per ovvi motivi la loro presenza è tuttavia strettamente correlata alla popolazione in cui la si esamina.

## **Obiettivi dello studio**

Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare le frequenze di alcuni SNP in pazienti siciliani con HCC HCV-correlati confrontati sia con un gruppo di pazienti cirrotici HCV-correlati e sia con soggetti sani, e determinare se esiste una possibile correlazione tra le varianti alleliche e il rischio di sviluppare il tumore.

In particolare, in questo studio sono stati presi in esame quattro SNP coinvolti nello sviluppo e progressione dell'epatocarcinogenesi: due polimorfismi su geni coinvolti nel pathway di risposta allo stress del reticolo endoplasmatico, geni Glucose-Regulated Protein, 78kDa (GRP78) e Activating Transcription Factor 6 (ATF6), e due localizzati nella regione genica di una proteina coinvolta nella risposta del sistema immunitario, la Major Histocompatibility class I polypeptide-related sequence A (gene MICA).

## **Materiali e Metodi**

La presente ricerca è stata condotta mediante uno studio caso-controllo. Sono stati raccolti campioni ematici di 250 soggetti sani (controlli), 100 soggetti cirrotici tutti HCV-correlati e 160 soggetti HCC tutti HCV-correlati. Tutti i soggetti inseriti in questo studio, controlli e casi (cirrotici e HCC) sono di razza caucasica e di origine siciliana.

Per i controlli e i casi sono stati raccolti dati clinici e per i controlli ci si è accertati inoltre dell'assenza di patologie, di infezioni virali, ecc. Tutti i soggetti inclusi nello studio hanno firmato un modulo di consenso informato.

Come sistemi di stadiazione della malattia epatica sono stati utilizzati lo Score di Child-Pugh e l'HCC è stato stadionato secondo la classificazione BCLC.

Da ciascun campione è stato estratto il DNA mediante Wizard® Genomic DNA Purification

Kit (Promega, Milano, Italia), la cui qualità e quantità è stata valutata mediante letture al NanoDrop™. Sono stati selezionati solo i campioni con qualità e quantità sufficienti a portare avanti la reazione di genotipizzazione. Scartando i campioni non adeguati la casistica utilizzata per lo studio è composta da 248 controlli, 96 cirrotici e 156 HCC. I dati sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1

		Caratteristiche dei campioni (N=500)		
		Controlli (N=248)	Cirrosi (N=96)	HCC (N=156)
Anni	<b>Media (range)</b>	61.35 (45-70)	59.65 (36-73)	73.46 (63-90)
Sesso	<b>Uomini (%)</b>	181 (73%)	66 (68.75%)	86 (55%)
	<b>Donne (%)</b>	67 (27%)	30 (31.25%)	70 (45%)
Parametri ematoclinici (media±SD)			Cirrotici (N=96)	HCC (N=156)
	<b>PLT</b>		105074 ± 6018	146603 ± 372235
	<b>AST (IU/L)</b>		62.5 ± 21	52.5 ± 26.1
	<b>ALT (IU/L)</b>		79.0 ± 45.2	50.0 ± 39.5
	<b>Bilirubina totale (mg/dL)</b>		0.425 ± 0.035	2.45 ± 0.07
	<b>Albumina (g/dL)</b>		3.85 ± 0.91	3.47 ± 0.33

La media dell'età dei soggetti sani è di 61.3, con un rapporto uomo:donna di circa 2.96:1. I soggetti affetti da cirrosi hanno un'età media di 59.6 anni, con un rapporto uomo:donna di 2.2:1 circa. Invece, i soggetti affetti da HCC hanno un'età media di 73.4 anni, con un rapporto uomo:donna di 1.2:1 circa.

La presenza degli SNPs è stata valutata mediante genotipizzazione diretta utilizzando la tecnica "KASPar SNP genotyping" (Kompetitive Allele Specific PCR), mentre l'analisi dei dati è stata effettuata grazie al programma di genotipizzazione SNPviewer.



## ***Analisi statistica***

La distribuzione allelica che abbiamo trovato nei controlli, nei pazienti con cirrosi e con HCC per i quattro polimorfismi analizzati rispettano l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Inoltre, le MAF (*minor allele frequency*) ricavate dai quattro SNPs nella popolazione controllo sono state confrontate con le MAF disponibili nel database NBCI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

La significatività è stata calcolata mediante p value e Odds-Ratio ricavati con Z-test in accordo con Sheskin (Sheskin DJ, CRC Press. 2004). Solo i valori di p value <0.05 sono stati considerati significativi.

## **Risultati**

### ***Studio dell'SNP rs430397 nel gene GRP78***

Nel nostro studio, per il polimorfismo rs430397 sono stati analizzati 248 soggetti sani, 94 cirrotici HCV-correlati e 151 HCC HCV-correlati. Nel nostro campione di soggetti controllo, la MAF è del 9.4%, simile a quella indicata dal database di dbSNP (9.8%).

Come è evidente dalla Tabella 2 le frequenze genotipiche e alleliche sono molto simili tra i controlli, i cirrotici e gli HCC. Dall'analisi statistica, infatti, non è stata evidenziata alcuna significatività. L'rs430397 sul gene GRP78 non rappresenta quindi un fattore di rischio per HCC HCV-correlati nella popolazione siciliana.

Tabella 2

rs430397

	Allele, n (%)		Genotipo, n (%)					
	G	A	G/G	G/A	A/A			
Controlli (N=244)	441 (90.74%)	45 (9.25%)	198 (81.50%)	45 (18.50%)	0			
Cirrotici (N=94)	173 (92.02%)	15 (7.97%)	80 (85.10%)	13 (13.82%)	1 (1.10%)			
HCC (N=151)	278 (92.05%)	24 (7.94%)	128 (84.80%)	22 (14.60%)	1 (0.7%)			
	<b>P value</b>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	<b>Cirrotici vs Controlli</b>	<b>P value</b>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	
<b>Controlli vs HCC</b>	0.5267	0.846	0.5042 - 1.4197	G/G vs G/A	0.3261	1.398	0.716 - 2.732	
<b>Controlli vs Cirrotici</b>	0.6009	0.8497	0.4616 - 1.5642	<b>HCC vs Controlli</b>				
<b>Cirrotici vs HCC</b>	0.9899	0.9957	0.5082 - 1.9506	G/G vs G/A	0.3249	1.322	0.7582 - 2.3062	
				<b>HCC vs Cirrotici</b>				
				G/G vs G/A	0.882	0.945	0.4509 - 1.9824	

### *Studio dell'SNP rs2070150 nel gene ATF6*

Nel nostro studio, per il polimorfismo rs2070150 sono stati analizzati 245 controlli, 93 cirrotici e 151 HCC.

La MAF ottenuta (6.5%) è simile a quella rilevata sul database dbSNP (7.4%). Come viene mostrato dalla Tabella 3, le frequenze genotipiche e alleliche si differenziano di poco tra casi e controlli. Infatti, l'analisi statistica non ha ottenuto dei valori di significatività di interesse. Anche questo SNP, quindi, non sembra essere associato al rischio di HCC HCV-correlati nella popolazione siciliana.

Tabella 3

**rs2070150**

	Allele, n (%)		Genotipo, n (%)				
	G	C	G/G	G/C	C/C		
Controlli (N=245)	457 (93.64%)	31 (6.35%)	213 (87,30%)	31 (12.70%)	0 (0.00%)		
Cirrotici (N=93)	168 (90.32%)	18 (9.67%)	75 (80.60%)	18 (19.40%)	0 (0.00%)		
HCC (N=151)	277 (91.72%)	25 (8.27%)	126 (83.40%)	25 (16.60%)	0 (0.00%)		
	<b>P value</b>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	<b>Cirrotici vs Controlli</b>	<b>P value</b>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>
<b>Controlli vs HCC</b>	0.3067	1.3305	0.7695 - 2.3006	G/G vs G/C	0.1242	0.6064	0.3205 - 1.1474
<b>Controlli vs Cirrotici</b>	0.14	1.5795	0.8607 - 2.8986	<b>HCC vs Controlli</b>			
<b>Cirrotici vs HCC</b>	0.5967	0.8424	0.4462 - 1.5903	G/G vs G/C	0.2875	0.7335	0.4144 - 1.2984
				<b>HCC vs Cirrotici</b>			
				G/G vs G/C	0.5777	1.209	0.619 - 2.3637

***Studio dell' SNP rs2596542 nel gene MICA***

Nel nostro studio abbiamo analizzato il polimorfismo rs2596542. Sono stati genotipizzati 242 controlli, 93 cirrotici e 150 HCC (Tabella 4). La MAF ottenuta (46.2%) si avvicina di molto alla MAF rilevata sul database dbSNP (41.6%). Dai risultati ottenuti si possono notare delle differenze nella distribuzione genotipica: nei cirrotici il 24.7% (23/93) dei pazienti presenta il genotipo AA, il 53.8% (50/93) presenta il genotipo AG e il 21.5% (20/93) presenta il genotipo GG. Nei pazienti tumorali il 24.6% (37/150) presenta il genotipo AA, il 42.6% (64/150) presenta il genotipo AG e il 32.6% (49/150) presenta il genotipo GG. Nonostante la differente distribuzione allelica i dati non hanno mostrato significatività statistica. In relazione al genotipo, invece, considerando la popolazione HCC verso i controlli si osserva un'associazione significativa tra la presenza dell'allele G in omozigosi (G/G) e un maggiore rischio di sviluppare l'HCC rispetto ai portatori in

eterozigosi (G/A) ( $p = 0.0364$ ; OD = 1.66; CI 95% compreso tra 0.37 e 0.96). Inoltre, paragonando i pazienti HCC verso i cirrotici, il genotipo G/G risulta anche essere associato ad un maggiore rischio di HCC rispetto al genotipo G/A ( $p = 0.046$ ; OD = 1.91; CI 95% compreso tra 1.01 e 3.62). Non abbiamo invece riscontrato un'associazione significativa per questo polimorfismo e il rischio di sviluppare la cirrosi ( $p > 0.05$ ). In base ai risultati ottenuti possiamo affermare che il polimorfismo rs2596542, in particolare nel caso dei portatori del genotipo G/G, è associato con il rischio di sviluppare HCC HCV-correlati nella popolazione siciliana.

Tabella 4

**rs2596542**

	Allele, n (%)		Genotipo, n (%)					
	A	G	A/A	A/G	G/G			
Controlli (N=242)	229 (47.31%)	255 (52.68%)	48 (19.80%)	133 (55.0%)	61 (25.20%)			
Cirrotici (N=93)	96 (51.61%)	90 (48.38%)	23 (24.70%)	50 (53.80%)	20 (21.50%)			
HCC (N=150)	138 (46.0%)	162 (54.0%)	37 (24.66%)	64 (42.66%)	49 (32.66%)			
	<i>P value</i>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	<b>Cirrotici vs Controlli</b>	<i>P value</i>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	
<b>Controlli vs HCC</b>	0.7201	1.0542	0.7898 - 1.4072	A/A vs G/G	0.2939	1.4615	0.7195 - 2.9684	
<b>Controlli vs Cirrotici</b>	0.319	0.8419	0.6002 - 1.181	A/A vs G/A	0.4233	1.2746	0.7038 - 2.3084	
<b>Cirrotici vs HCC</b>	0.229	1.2522	0.868 - 1.8063	G/A vs G/G	0.6553	1.1466	0.6289 - 2.0906	
				<b>HCC vs Controlli</b>	<i>P value</i>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	
				A/A vs G/G	0.8873	0.9596	0.5425 - 1.6973	
				A/A vs G/A	0.077	1.6019	0.9502 - 2.7006	
				G/A vs G/G	<b>0.0364</b>	<b>1.6693</b>	<b>0.3707 - 0.968</b>	
				<b>HCC vs Cirrotici</b>	<i>P value</i>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>	
				A/A vs G/G	0.2624	0.6566	0.3146 - 1.3704	
				A/A vs G/A	0.4829	1.2568	0.6637 - 2.38	
				G/A vs G/G	<b>0.0462</b>	<b>1.9141</b>	<b>1.0111 - 3.6236</b>	

### *Studio dell'SNP rs2596538 nel gene MICA*

In questo studio sono stati genotipizzati 244 controlli, 87 cirrotici HCV-correlati e 144 HCC HCV-correlati. La MAF ottenuta, 47.3%, è simile quella rilevata sul dbSNP (43.6%). La distribuzione genotipica e allelica (Tabella 5) anche in questo caso si presenta in modo differente tra i controlli, i pazienti cirrotici e HCC. Nei soggetti controlli il 19.7% (48/244) presenta il genotipo TT, il 55.3% (135/244) presenta il genotipo TC e il 25.0% (61/244) presenta il genotipo CC. Nei cirrotici il 26.4% (23/87) dei pazienti presenta il genotipo TT, il 52.9% (46/87) presenta il genotipo TC e il 20.7% (18/87) presenta il genotipo CC con una frequenza totale dell'allele C pari a 0.471. Invece, nei pazienti tumorali il 21.5% (31/143) presenta il genotipo TT, il 43.1% (62/143) presenta il genotipo TC e il 35.4% (51/143) presenta il genotipo CC con una frequenza totale dell'allele C pari a 0.566. L'analisi statistica indica che la frequenza dell'allele C determina un maggiore rischio di sviluppare l'HCC rispetto all'allele T ( $p = 0.040$ ; OD = 1.482; CI 95% compreso tra 1.01 e 2.16). Inoltre, risultati interessanti sono stati ottenuti dall'analisi sulla frequenza del genotipo negli HCC vs controlli; infatti, gli omozigoti per l'allele C hanno una frequenza maggiore nei pazienti con HCC rispetto a quelli che posseggono il genotipo T/C ( $p = 0.014$ ; OD uguale a 1.82 CI 95% compreso tra 1.12 e 2.93). Anche la distribuzione genotipica tra HCC e cirrotici mostra un'associazione significativa; il genotipo C/C risulta fortemente associato ad un maggiore rischio di HCC rispetto al genotipo G/A ( $p = 0.027$ ; OD = 2.10; CI 95% compreso tra 1.08 e 4.06). Non abbiamo invece riscontrato un'associazione significativa per il polimorfismo rs2596538 e il rischio di sviluppare la cirrosi ( $p > 0.05$ ).

I risultati ottenuti sono in accordo con l'osservazione generale di una maggiore frequenza del genotipo CC dell'SNP rs2596538 nei pazienti HCC HCV-correlati. Tutto ciò sembra

evidenziare come il genotipo CC sia un possibile marcatore di rischio di HCC HCV-correlati.

Tabella 5

rs2596538

	Allele, n (%)		Genotipo, n (%)		
	T	C	T/T	T/C	C/C
Controlli (N=244)	231 (47.32%)	257 (52.66%)	48 (19.75%)	135 (55.30%)	61 (25.00%)
Cirrotici (N=87)	92 (52.87%)	82 (47.12%)	23 (26.40%)	46 (52.90%)	18 (20.70%)
HCC (N=144)	124 (43.05%)	164 (56.94%)	31 (21.50%)	62 (43.10%)	51 (35.40%)
	<b>P value</b>	<b>OD</b>	<b>CI95%</b>		
<b>Controlli vs HCC</b>	0.2477	1.1888	0.8867 - 1.5939		
<b>Controlli vs Cirrotici</b>	0.21	0.8011	0.5664 - 1.1331		
<b>Cirrotici vs HCC</b>	<b>0,0408</b>	<b>1.4839</b>	<b>1.0166 - 2.1659</b>		
				<b>P value</b>	<b>OD</b>
<b>Cirrotici vs Controlli</b>					<b>CI95%</b>
C/C vs T/T				0.1891	0.6158
C/C vs T/C				0.6509	0.866
T/T vs T/C				0.2648	1.4
<b>HCC vs Controlli</b>				<b>P value</b>	<b>OD</b>
C/C vs T/T				0.3871	1.2946
C/C vs T/C				<b>0.0141</b>	<b>1.8205</b>
T/T vs T/C				0.2181	1.4063
<b>HCC vs Cirrotici</b>				<b>P value</b>	<b>OD</b>
C/C vs T/T				0.0558	2.1022
C/C vs T/C				<b>0.0271</b>	<b>2.1022</b>
T/T vs T/C				1	1
					<b>CI95%</b>
					0.2987 - 1.2696
					0.4644 - 1.615
					0.7724 - 2.5603
					0.7212 - 2.3238
					<b>1.1285 - 2.9369</b>
					0.8174 - 2.4193
					0.9818 - 4.5012
					<b>1.0876 - 4.063</b>
					0.5165 - 1.936

## Conclusioni e prospettive future

In conclusione, lo sviluppo del seguente progetto ha permesso di identificare i polimorfismi genetici rs2596542 e rs2596538 sul gene MICA associati ad un potenziale rischio di sviluppo dell'HCC HCV-correlati nella popolazione siciliana. Non abbiamo ottenuto però il medesimo risultato con l'analisi dei polimorfismi sui geni coinvolti nei pathway di risposta allo stress del reticolo endoplasmatico (rs430397 nel gene GRP78 e rs2070150 nel gene ATF6).

Questa indagine contribuisce, inoltre, a chiarire perché alcuni pazienti cirrotici rispetto ad altri siano più o meno suscettibili allo sviluppo di HCC. Lo screening genetico potrebbe

quindi essere uno strumento di indagine utile per identificare quei sottogruppi di cirrotici HCV-correlati a maggiore rischio di sviluppare il cancro per i quali sarebbe opportuno applicare strategie di screening e terapeutiche preventive.

## Bibliografia

1. Sanyal AJ, Yoon SK, Lencioni R. 2010. The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *15 Suppl 4*:14-22
2. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004 Nov; 127(5 Suppl 1):S35–S50. [PubMed: 15508101]
3. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. *Arch Intern Med*. 1990 May; 150(5):1051–4. [PubMed: 2158773]
4. Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, et al. Taiwan Hepatoma Study Group. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1348–1355
5. Yang JD, Kim WR, Coelho R, et al. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan; 9(1):64–70. [PubMed: 20831903]
6. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2002 Jul 18; 347(3):168–74. [PubMed: 12124405] 10. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes
7. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2009 May; 49(5 Suppl):S72–S84. [PubMed: 19399801]
8. Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. 2010 May; 138(5):1747–54. [PubMed: 20114048]



9. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increasethe risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology*. 2003 Feb; 124(2):327–34. [PubMed: 12557138]
10. Goodgame B, Shaheen NJ, Galanko J, El Serag HB. The risk of end stage liver disease and hepatocellular carcinoma among persons infected with hepatitis C virus: publication bias? *Am J Gastroenterol*. 2003 Nov; 98(11):2535–42. [PubMed: 14638360]
11. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001 Oct; 34(4 Pt 1):809–16. [PubMed: 11584380]
12. Garner RC, Miller EC, Miller JA. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B 1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res*. 1972 Oct; 32(10):2058–66.[PubMed: 4404160]
13. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991 Apr 4; 350(6317):429–31. [PubMed: 1672732]
14. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology* 2012 vol. 56 j 671–685
15. Modi AA, Feld JJ, Park Y, et al. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2010 Jan; 51(1):201–9. [PubMed: 20034049]
16. M.M. Hassan, L.Y. Hwang, C.J. Hatten, *et al*. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*, 36 (2002), pp. 1206–1213
17. H.B. El-Serag, P.A. Richardson, J.E. Everhart. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States veterans. *Am J Gastroenterol*,

96 (2001), pp. 2462–2467

18. Xiao Zhu, Min-Shan Chen, Lin-Wei Tian, Dong-Pei Li, Pei-Lin Xu, Marie C. M. Lin, Dan Xie, Hsiang-Fu Kung, Int. J. Cancer: 125, 1352–1357 (2009) Single nucleotide polymorphism of rs430397 in the fifth intron of GRP78 gene and clinical relevance of primary hepatocellular carcinoma in Han Chinese: Risk and prognosis.
19. Xiao Pan Wu, Zhenhui Xin, Wei Zhang, Sujun Zheng, Jia Wu, Kangmei Chen, Huifen Wang, Xilin Zhu, Zhuo Li, Zhongping Duan, Hui Li, and Ying Liu. Int. J. Cancer: 135, 61–68 (2014) A missense polymorphism in ATF6 gene is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma probably by altering ATF6 level.
20. Kumar et al., Nat Genet. 2011. Genome - wide association study identifies a susceptibility locus for HCV - induced hepatocellular carcinoma.
21. Paulisally Hau Yi Lo, Hau Yi Lo, Yuji Urabe, Vinod Kumar, Chizu Tanikawa, Kazuhiko Koike, Naoya Kato, Daiki Miki, Kazuaki Chayama, Michiaki Kubo, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda. PLoS One Aprile2013|Volume 8|Issue 4| Identification of a Functional Variant in the MICA Promoter Which Regulates MICA Expression and Increases HCV-Related Hepatocellular Carcinoma Risk .